

Identificação e clonagem dos genes que codificam proteínas de membrana translocadoras de fosfatidil serina em *Leishmania*.

Candidato: Rafael Lemes Beirigo

Orientador: Lucile Maria Floeter Winter

Resumo

A fosfatidilserina (PS), ao ser exposta na face externa da membrana plasmática, tem um papel funcional importante na remoção de células em apoptose pelo macrófago sem a instalação do processo inflamatório. Esforços iniciais de se obter um organismo nocaute para a síntese de fosfatidilserina não resultaram no mutante esperado, demonstrando ser a via essencial para o parasita. Neste projeto pretende-se determinar o papel funcional da PS na invasão e inativação dos macrófagos por *Leishmania*. Para atingir esse objetivo serão identificadas as enzimas envolvidas no transporte de PS através da membrana do parasita. Essa identificação permitirá simultaneamente a clonagem dos fragmentos gênicos que as codificam. Os genes serão então caracterizados quanto à sua expressão, nas diferentes fases do ciclo de vida do parasita, buscando-se responder a questão: há expressão diferencial dos genes durante a metaciclogênese, explicando um aumento de translocação da fosfatidil-serina?

Introdução

Os organismos do gênero *Leishmania*, identificados inicialmente por Ross (Ross, 1903 apud (Rey 2001)), pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. São parasitas que apresentam dois hospedeiros obrigatórios, sendo o ciclo de vida desenvolvido em um inseto (flebotomíneo) e um mamífero. No hospedeiro mamífero, é parasita obrigatório de macrófagos. Nessa célula, encontra-se a forma amastigota, células redondas e sem flagelo aparente, contidas em vacúolos digestivos, ou fagossomos. O ciclo natural do parasito não inclui o homem, esse aparece como um hospedeiro acidental após ser picado pelo inseto vetor, e pode desenvolver diferentes patologias, genericamente denominadas leishmanioses.

No inseto, encontram-se as formas promastigotas, alongadas, de aspecto fusiforme e flageladas que quando em grande número se diferenciam em promastigotas metacíclicas infectivas e invadem porções anteriores do esôfago e proventrículo do mosquito. No repasto sanguíneo desse mosquito, são inoculadas no novo hospedeiro mamífero, sendo fagocitadas por macrófagos residentes e diferenciam-se em formas amastigota (Rey 2001).

Os macrófagos são células de defesa dos mamíferos que se originam a partir de monócitos que migram da corrente sanguínea para diferentes tecidos e em conjunto com

os monócitos constituem o sistema de fagócitos profissionais do corpo. Essas células contêm lisossomos especializados que se fundem às vesículas fagocíticas recém formadas, expondo o microorganismo fagocitado a um complexo de hidrolases e a um conjunto de moléculas altamente reativas que são produzidas enzimaticamente, como peróxido de hidrogênio, hipoclorito e óxido nítrico. Organismos do gênero *Leishmania* são capazes de evitar a atividade microbicida dos macrófagos e se estabelecerem como parasitas intracelulares dessas células. Além do papel no combate a microorganismos invasores, os macrófagos também atuam na remoção de células que entraram em processo de morte celular, seja por necrose ou apoptose. No caso de células em apoptose, o fagócito é capaz de reconhecer sinais apresentados na superfície de suas membranas plasmáticas, distinguindo-as das células ainda viáveis, e removendo-as sem serem ativados e sem o recrutamento de novos fagócitos (Fadok, de Cathelineau et al. 2001).

Um dos sinais reconhecido pelos fagócitos em células em apoptose é a passagem da fosfatidilserina (PS), normalmente encontrada exclusivamente na face interna da membrana plasmática, para a face externa (Wu, Tibrewal et al. 2006), sendo esse um dos primeiros eventos da morte celular programada (Fadok, de Cathelineau et al. 2001). O reconhecimento de moléculas de PS na superfície de células em apoptose leva a uma desativação do fagócito, caracterizado pela expressão das citocinas antiinflamatórias como TGF- β e IL-10, e inibição da expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α (Fadok, Bratton et al. 2001).

Foi mostrado que amastigotas de *L.(Leishmania) amazonensis* expõem fosfatidilserina assim como as células em apoptose (de Freitas Balanco, Moreira et al. 2001). Foi mostrado também que quando as células eram previamente tratadas com anexina-V, que se liga especificamente a fosfatidilserina, a virulência das leishmânias era reduzida em mais de 50% e não era observada a produção de TGF- β 1 e IL-10 pelos macrófagos. Os autores propuseram que esse seria um mecanismo de mimetismo de células em apoptose que as leishmânias utilizariam para poder invadir os macrófagos sem ativá-los (de Freitas Balanco, Moreira et al. 2001).

A movimentação de fosfolipídios entre as faces da membrana plasmática está relacionada a três atividades enzimáticas descritas: flipases, flopases e escramblases. A atividade de flipases é responsável pela passagem de fosfolipídios da face externa para a interna da membrana plasmática. As translocases descritas em mamíferos com essa atividade possuem uma alta especificidade para fosfatidilserina ou um grupo restrito de fosfolipídios (Daleke and Lyles 2000). A atividade de flopases é responsável pelo deslocamento de fosfolipídios da face interna para a externa da membrana plasmática. Essas translocases normalmente possuem uma especificidade menor do que as flipases, com proteínas individuais translocando uma variedade maior de fosfolipídeos. Em leishmânia, existe um membro dessa família que foi apontado como envolvido no tráfego de fosfolipídios (Araujo-Santos, Parodi-Talice et al. 2005).

Tendo em vista as informações acima, o presente projeto tem por objetivo identificar e clonar os genes que codificam as principais proteínas translocadoras de fosfolipídeos, utilizadas pelos parasitas para a exposição de fosfatidilserina na face externa de sua membrana plasmática. Assim, pretendemos:

- 1– Realizar a caracterização molecular das enzimas envolvidas nas atividades de flipase e flopase de fosfatidilserina em leishmânias, isolando o fragmento gênico que as codificam;
- 2– Caracterizar a expressão desses genes ao longo do ciclo de vida do parasita, verificando se há expressão diferencial relacionadas com a maior exposição do fosfolipídeo e com a infectividade da forma.

Estratégias experimentais

O organismo modelo que será utilizado nos experimentos é *L. (L.) amazonensis*. Para se isolar o gene responsável pela atividade de flopase de fosfatidilserina, serão feitas transfecções de leishmânia com uma biblioteca genômica de *L.(L.)amazonensis* (Uliana, Goyal et al. 1999). As células que receberem o cosmídeo contendo o gene responsável pela atividade de flopase de fosfatidilserina devem ter esse gene superexpresso, desfazendo o equilíbrio entre as atividades de flipase e flopase e fazendo com que a célula passe a expor fosfatidilserina continuamente. As células com essa característica podem então ser isoladas utilizando-se “kits” para purificação de células em apoptose, que permitem separar células que expõem PS do restante da população. Após seu isolamento, o cosmídeo presente nas células será caracterizado para identificar os genes que carrega.

De maneira inversa, o gene responsável pela atividade de flipase poderá ser isolado, tratando-se uma cultura de leishmânia com agentes mutagênicos, de modo a se obter mutações aleatórias no genoma desses organismos. Mutantes do gene responsável pela atividade de flipase de fosfatidilserina irão acumular PS na face externa da membrana plasmática e poderão ser selecionadas utilizando-se o “kit” para purificação de células em apoptose. Esses mutantes então poderão ser receptores de uma transfecção com a biblioteca genômica a fim de resgatar o fenótipo selvagem por complementação. Novamente, a seleção se fará utilizando-se o “kit” para purificação de células em apoptose, dessa vez guardando-se aquelas células que não ficarem presas à coluna. A análise dos cosmídeos que essas leishmânias receberam deve permitir a identificação dos genes envolvidos na atividade de flipase.

Uma vez que se tenha identificado os genes de interesse, esses serão seqüenciados e comparados aos bancos de dados de genomas de *Leishmania*, utilizando-se ferramentas de bioinformática e também serão feitos experimentos visando quantificar sua expressão ao longo do ciclo do parasita, por Northern blot ou por RTPCR quantitativo de RNA total.